

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保と
リスクコミュニケーションのための研究」
分担研究報告書

ゲノム編集に関する情報収集解析、ケーススタディーおよびアレルゲン分解性

研究分担者 近藤 一成 （国立医薬品食品衛生研究所）

研究要旨：

ゲノム編集食品の届出制度運営にあたり、安全性審査が必要でなく届け出になったこと、届け出制度内での安全性確認について、判断根拠となる科学的背景が技術について整理されていることが重要である。本研究では、今年度は自然変異、放射線や変異原物質を用いた突然変異誘導法、およびゲノム編集法の特長について科学文献をもとに調査整理した。その結果、放射線や変異原物質を用いた突然変異誘導法によるイネの研究では 変異頻度は $(23.1 \pm 1.5) \times 10^{-8}$ per/bp と自然変異の数十倍で、大部分が数塩基 (+1 bp ~ -4 bp) の Indel であった。一方、ゲノム編集では変異頻度は高いものでは数十%に達し、場合によりオフターゲットも数%になることもある。また、ゲノム編集では DNA 2 本鎖切断後もゲノム上の標的配列から遊離しないため、修復過程に影響することが考えられ、その遊離を促進することができれば意図しない変化を一層低減できるのではないかと示唆された。

ゲノム編集技術を用いた研究の文献調査では、2018 年から 2019 年を調査した。研究報告が多かった順に、rice 130 件、tomato 45 件、wheat 21 件、maize 20 件のほか grape 3 件、apple 3 件、banana 2 件、melon 1 件などであった。病害虫耐性、高塩耐性、生産性向上などの形質が多かった。

アレルゲン評価に用いる資料の一つであるタンパク分解性について、pH 変化による影響を実験的に検討した。ピーナッツの主要アレルゲンの一つである Ara h1 をピーナッツより精製して、異なる pH、pepsin 濃度で分解性試験を行った。その結果から、これまで比較的分解しやすいと考えられている Ara h1 は pH 2 では速やかに分解されるものの、pH 3.3 ではほとんど分解されずに残っていることが分かり、タンパク分解性は胃（の酸性度）の状態により大きく異なり、アレルゲン性評価にはより詳細な検討が必要と考えられた。EFSA においても、同様の検討がされており継続して行う必要があると考えられた。

研究協力者 中島 治 （国立医薬品食品衛生研究所）

研究協力者 小野 竜一 （国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

ゲノム編集技術を利用した作物（ゲノム編集作物）から作られる新たな食品の研究開発が国内外で活発に行なわれている。ゲノム編集作物では、従来の遺伝子組換え作物のような外来遺伝子を導入することはなく、内在性遺伝子の配列を数塩基欠失により機能欠失させて新たな形質（もち性向上、筋肉量増加、GABA 量増加など）を付与できる。しかしながら、最終的に外来遺伝子が存在しないゲノム編集作物は、規制上（食品衛生方法上）どう扱われるか、また、ゲノム編集食品の安全性を確認するために新たに必要とされる分析手法は何か、などは十分に議論されてきたとは言えない。一方で、ゲノム編集技術を利用した食品（ゲノム

編集食品）の届出・事前相談制度が平成 31 年 10 月から開始された。そこでは、安全性審査が不要であるとする根拠として、従来から安全に用いられてきた突然変異育種（放射線など）と起きる変化が同等であることとされた。ゲノム編集食品の届出制度を運営するにあたり、突然変異育種との同等性を考える判断根拠となる科学的背景やゲノム編集技術の特性、応用例について、十分に調査研究することが必要である。

本研究では、ゲノム編集作物の開発状況の情報収集を PubMed、Scifinder などデータベースを用いて文献等調査を行い、自然変異、放射線による突然変異、ゲノム編集技術による変異誘導について調査整理を行った。また、タンパクのアレルゲ

ン性とも関連するタンパク分解性試験について、EUではヒトの実際に合わせた細かい条件での検討が推奨されているため、国内においてもその影響を考える必要が生じている。そのため、人工胃液による分解性試験条件、酵素濃度・pHについて細かく設定して検討して分解性に与える影響を調査した。

B. 研究方法

1. ゲノム編集食品の届出制度での安全性確認に関わる判断の科学的背景・技術特性調査

植物・動物（細胞）を主な対象に、自然変異、放射線による突然変異誘導、ゲノム編集による変異誘導について、定量的な解析がされた科学論文を中心に調査整理した。

2. 研究開発に関する文献調査

データベースとして PubMed、SciFinder を主に用いて 2018 年から 2019 年前半について検索した。検索キーワードは、表 1 の A 群と B 群から 1 つずつ選んだ物を組み合わせて利用した。検索によりヒットした文献から、タイトル・書誌情報とアブストラクトの情報をもとにヒットした文献についてリストを作成した。リストの項目を以下に示す。（文献 ID（通し番号）、生物種（動物、植物）、種名（ブタ、ウシ等）、用いた技術、雑誌名、タイトル、発表年、巻・号・ページ、著者名、所属機関、国、Pubmed ID, DOI, ターゲット遺伝子名）。

3. 人工消化液によるタンパク分解性試験（酵素濃度・pH 条件の影響）

ピーナッツアレルゲン Ara h1 の精製は、ピーナッツ 10.5 g から既報に基づいて硫安沈殿、イオン交換クロマトグラフィーにより行い、N 末端アミノ酸分析および質量分析により、Ara h1 であることを同定確認した。最終的に 3.1 mg の Ara h1 を得た。

タンパク分解性試験は、EFSA の意見書に基づいて、ペプシン濃度（高濃度、低濃度）と pH（2.0, 3.3, 5.5）で、ペプシン濃度は高濃度の条件として、ペプシン：テストタンパク質=10 U：1 mg とした。ペプシンの低濃度の条件として 1000 U/mL とした。インキュベーションの条件は 37°C で、1, 2, 5, 10, 30, 60, 120 分として実験を行った。

C. 研究結果および考察

1. ゲノム編集食品の届出制度での安全性確認に関わる判断の科学的背景・技術特性調査

自然変異、放射線や変異原物質を用いた突然変異誘導法（遺伝子組換え規制外）、およびゲノム編集法の特性や応用例について科学文献をもとに調査整理した。

まず、自然に起きる突然変異についてのシロイヌナズナを 30 世代観察した結果から、1 世代/場所当たりの発生頻度（ $\times 10^{-9}$ ）は

塩基置換では $5.9-7.1 \pm 0.6-0.7$

挿入欠失では 0.6 ± 0.2

で、G:C→A:T 変異が主であった。

次に、突然変異導入による突然変異頻度についての放射線を用いた突然変異誘導法によるイネの研究の例から、変異頻度（ $\times 10^{-8}$ ）は

トータルで 23.1 ± 1.5

と自然変異の数十倍で、大部分が数塩基（+1 bp～-4 bp）の挿入欠失であった。24 の変異のうち、15 変異は小さな欠失（1～16 bp）、4 変異は大きな欠失（9.4～130 kb）、3 変異は 1 塩基置換であり、中間の大きさの欠失（100 bp～8 kb）はなかった。

ゲノム編集では、変異頻度は高いものでは数十%に達し、場合によりオフターゲットも数%になることもある。また、ゲノム編集では DNA 2 本鎖切断後もゲノム上の標的配列から遊離しないため、修復過程に影響することが考えられ、その遊離を促進することができれば意図しない変化を一層低減できるのではないかと示唆された。

まとめたものを別添にした。

2. 研究開発に関する文献調査

ゲノム編集技術を用いた研究開発の文献 2018 年から 2019 年について調査した。その結果、動物ではゲノム編集技術を用いたものが 853 件、植物ではゲノム編集のほか新育種技術を含めて 1,924 件抽出された。

食品となる植物で研究報告が多かったものは順に、rice 130 件、tomato 45 件、wheat 21 件、maize 20 件、brassica 属 20 件、soybean 19 件、strawberry 4 件、grape 3 件、apple 3 件、coffee 3 件、carrot 3 件、banana 2 件、barley 2 件、kiwi 2 件、lettuce 2 件、peanuts 2 件、Chinese kale 2 件、peanuts 2 件、melon 1 件、blueberry 1 件、papaya 1 件、cucumber 1 件、pear 1 件などであった。それ以外の植物では Arabidopsis と

nicotiana がそれぞれ 76 件と 42 件が主で研究用と考えられた。

一方、食品となる動物で研究報告が多かったものは順に、chicken 22 件、cow 16 件、sheep 12 件、salmon 4 件、pig 2 件、shrimp 2 件などであった。それ以外の動物では、zebrafish 168 件および medaka 11 件、が主であった (表 2)。目的形質としては、病虫害耐性、高塩耐性、生産性向上などの形質が多かった。なお、開発動向調査結果はページ数が多いため各分担報告書の後に表 3 として加えた。

また、これまでにない傾向として、タンパクをコードする遺伝子ではなく、それらを制御する低分子 RNA の一つである miRNA を標的にした応用例が、研究用生物 zebrafish などで見られた。今後、遺伝子制御因子を標的にした事例が増加する可能性も考えられた。

3. 人工消化液によるタンパク分解性試験 (酵素濃度・pH 条件の影響)

ピーナッツアレルゲン Ara h1 を pH2.0 でペプシン濃度を変えて (高濃度、低濃度) 120 分間人工胃液で消化させたところ、両条件で 1 分以内に SDS-PAGE 上からバンドが消失したことから速やかに分解されたが、1~6 kDa 付近にバンドが生成した (図 1、2)。原理的には、この程度の大きさでもエпитープとして機能しうることから患者血清を用いた検討を行ったところ、患者血清とは反応しなかった。一方、pH3.3 の条件ではほとんど分解されなかった。未分解の Ara h1 のバンドは、ピーナッツ患者血清に反応した。ヒトの胃内環境は、食事によって大きく変化する。例えば、pH は 2 から 6 程度まで大きく変化することが判っている。また、制酸剤を服用している人も pH は 2 より大きい。今回の検討から、pH 条件が 2.0 から 3.3 に変化しただけで Ara h1 の人工胃液による分解性は劇的に変化した。また、pH 2.0 条件下で低分子の分解物が認められた。患者血清とは反応しなかったが、分解条件により抗原性が保持されている場合も想定される。以上の検討から、タンパクアレルゲン性評価資料の一つになっている分解性試験について、その条件を含めて詳細に検討することが、今後のアレルゲン性評価に重要であると考えられた。

D. 結論

自然変移、放射線を利用した積極的変異誘導、ゲノム編集技術を利用した変異誘導による育種に関する調査から、放射線育種では後代交配選抜によって得られた植物に誘導された変異は数塩基と小さいものが主であることが明らかになった。この育種過程では、後代交配が重要な役割を果たしていると考えられた。ゲノム編集技術による変異誘導も小さな変異が主であるが、少ない確率でオフターゲットが起きることに加えて、何世代にもわたる後代交配を行わないこと、DNA 修復にあたる影響など、未知の部分も存在していることから、安全性の観点から更なる研究が必要であると考えられた。

ゲノム編集技術を用いた品種開発では、植物においては特に多くの作物種で研究が行われていることが分かった。なかでも、イネの研究は非常に多く、今後の動向に注目する必要がある。動物ではニワトリなどが多いが、事例数は植物に比べて少ない。

タンパク分解性試験では Ara h1 においては、pH による大きな差が認められ、Ara h1 の性質についての有益な情報が得られた。他のアレルゲンでもこのような研究から有用な情報が得られる可能性があると考えられた。

E. 業績

1. 論文発表

- 1) Narushima, J., Kimata, S., Soga, K., Sugano, Y., Minegishi, Y., Kishine, M., Takabatake, R., Mano, J., Kitta, K., Kanamaru, S., Shirakawa, N., Kondo, K., Nakamura, K. Rapid DNA template preparation directly from a rice sample without purification for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of rice genes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84, 670-677, 2020
- 2) Soga, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Kimata, S., Ohmori, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Nagoya, H., Kondo, K. Data representing applicability of developed growth hormone 1 (GH1) gene detection method for detecting Atlantic salmon (*Salmo salar*) at high specificity to processed salmon commodities. *Data in*

Brief, 104695, 2019

- 3) Soga, K., Nakamura, K., Ishigaki, T., Kimata, S., Ohmori, K., Kishine, M., Mano, J., Takabatake, R., Kitta, K., Nagoya, H., Kondo, K. Development of a novel method for specific detection of genetically modified Atlantic salmon, AquAdvantage, using real-time polymerase chain reaction. *Food Chemistry*, 305, 125426, 2020

2. 学会発表

- 1) 中村公亮、木俣真弥、成島純平、志波優、秋本智、曾我慶介、権藤崇裕、明石良、近藤一成：ゲノム編集生物に残留する意図せざる DNA 切断の予測・検出法の評価、日本薬学会、第 140 年会、京都、2020 年 3 月
- 2) 成島純平、中村公亮、木俣真弥、志波優、秋本智、曾我慶介、権藤崇裕、明石良、近藤一成：2017 年中に発表されたゲノム編集イネのオフターゲット効果に関する評価、日本農芸化学会、2020 年度福岡大会、福岡、2020 年 3 月
- 3) Kazunari Kondo, Kozue Sakata, Reiko Kato, Akio Noguch. Identification of toxic plants that cause severe food poisoning using real-time PCR. Recent Advances in Food Analysis Prague, Czech Republic, Nov.5-8 (2019)

3. 講演会、説明会等の社会貢献

- 1) ゲノム編集技術を利用して得られた食品等に関する意見交換会、近藤一成、厚労省・消費者庁・農水省主催 2019 7.4 (東京) 2019 7.12 (福岡)
- 2) ゲノム編集技術を利用した食品等とその取扱い、近藤一成、日本食品工業倶楽部 月例会 (2019.6.27、東京)
- 3) ゲノム編集技術応用食品の現状と課題、北嶋聡、近藤一成、日本食品化学会 第 35 回食品化学 (2019.11.8、東京)

- 4) 第 17 回食品安全フォーラム「ゲノム編集技術を利用した食品の安全性確保の取組み」、近藤一成、日本薬学会主催 (2019.11.29、東京)

- 5) 食品衛生学会特別シンポジウム、近藤一成、日本食品衛生学会主催 (2020.2.13、東京)

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表1 研究開発に関する文献調査の検索キーワード

i) 動物の場合（ゲノム編集のみが対象）

	キーワード	備考
A 群	zinc finger nuclease, ZFN, TALEN, TAL effector, CRISPR, Cas9, Cpf1	ゲノム編集
B 群	pig, cow, chicken, fish, sheep, goat	動物の種類

ii) 植物の場合（ゲノム編集を含む新育種技術全体が対象）

	キーワード	備考
A 群	zinc finger nuclease, ZFN, TALEN, TAL effector, CRISPR, Cas9, Cpf1	ゲノム編集
	ODM, oligonucleotide-directed mutagenesis, targeted nucleotide exchange, TNE	オリゴヌクレオチド指定突然変異
	Cisgenesis	シスジェネシス
	Intragenesis	イントラジェネシス
	RdDM, RNA-depending DNA methylation	RNA 依存性 DNA メチル化
	Transgrafting, transgraft, graft & siRNA	接ぎ木
	Reverse breeding	逆育種
	Agroinfiltration	アグロインフィルトレーション
B 群	plant	

表2 ゲノム編集技術を用いた研究動向調査の結果

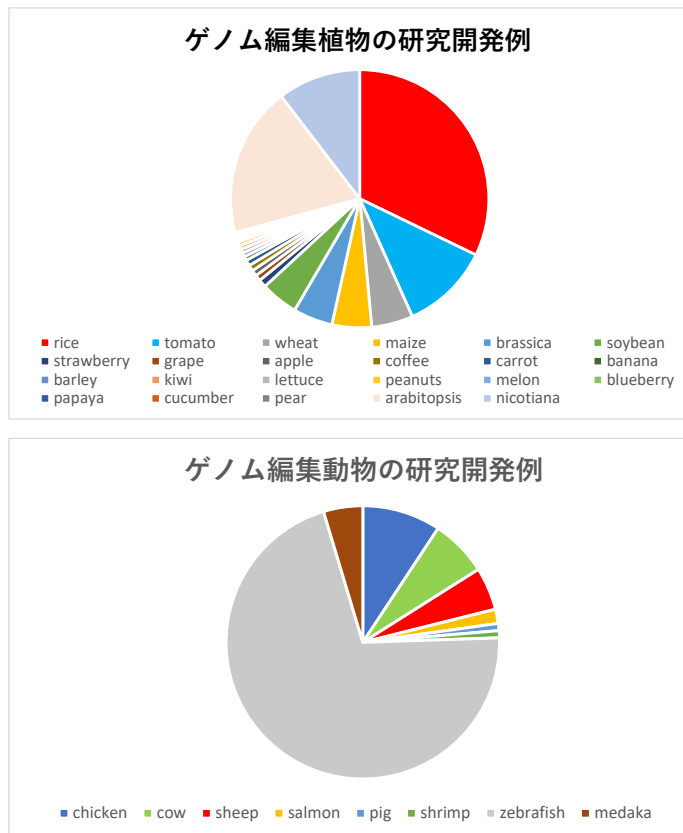
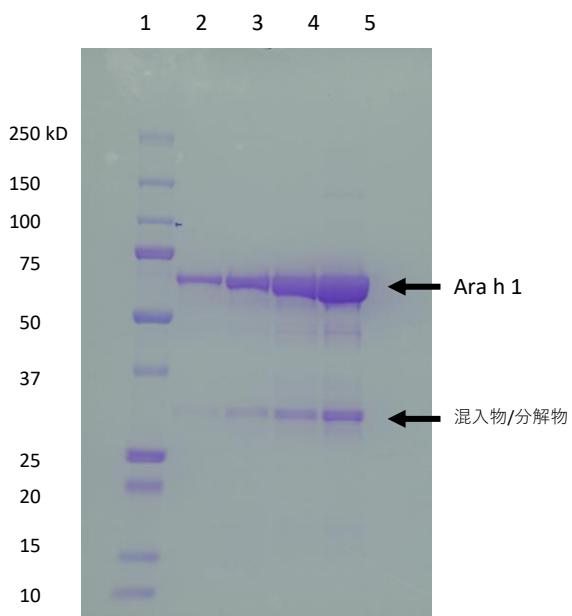


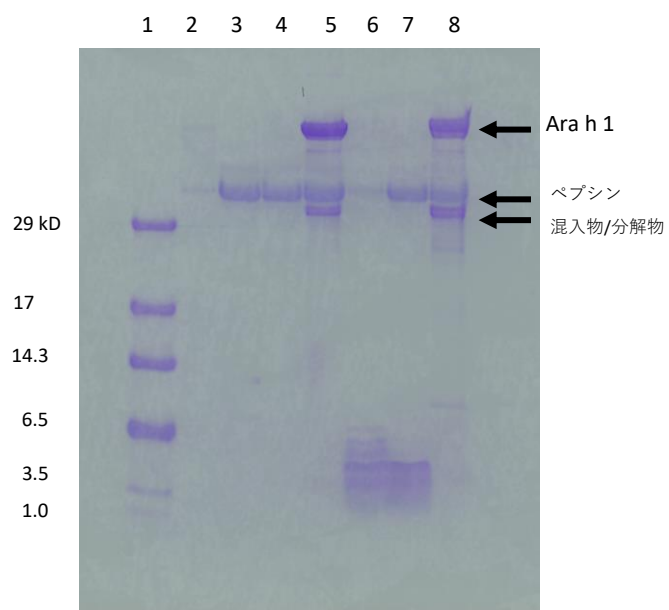
表3 （電子版に掲載）

図1 精製したAra h 1の純度確認



レーン 1 : 分子量マーカー
 レーン 2 - 5 : 精製したAra h 1, 0.6, 1.3, 2.5, 5.0 µg

図2 Ara h 1の分解性試験



レーン 1 : 分子量マーカー
 レーン 2 - 4 : Ara h 1無し (コントロール)
 レーン 5 - 8 : Ara h 1有り
 レーン 2, 6 : pH 2.0, 低ペプシン濃度, 120分
 レーン 3, 7 : pH 2.0, 高ペプシン濃度, 120分
 レーン 4, 8 : pH 3.3, 高ペプシン濃度, 120分
 レーン 5 : 0分

1. 自然突然変異の割合 (植物および動物細胞の例)

1-1 動物細胞 (ヒト細胞)

生物種: ヒト B 細胞株 (thymidine kinase mutant ($TK^{-/-}$) TK6)

引用論文: Schwartz *et al*, *Mutagenesis*, **19**, 477-482 (2004)

内容: TK 遺伝子変異に対する自然突然変異による復帰を指標にした生育頻度を基に、自然変異頻度を算出している。一遺伝子に起きる自然突然変異の頻度は次のようである。

$(2.73 \pm 0.78) \times 10^{-6} / \text{cell}$ であった

これは、他の遺伝子($HPRT^*$)での解析結果の、 $1 \sim 10 \times 10^{-6} / \text{cell}$ と同じであった。

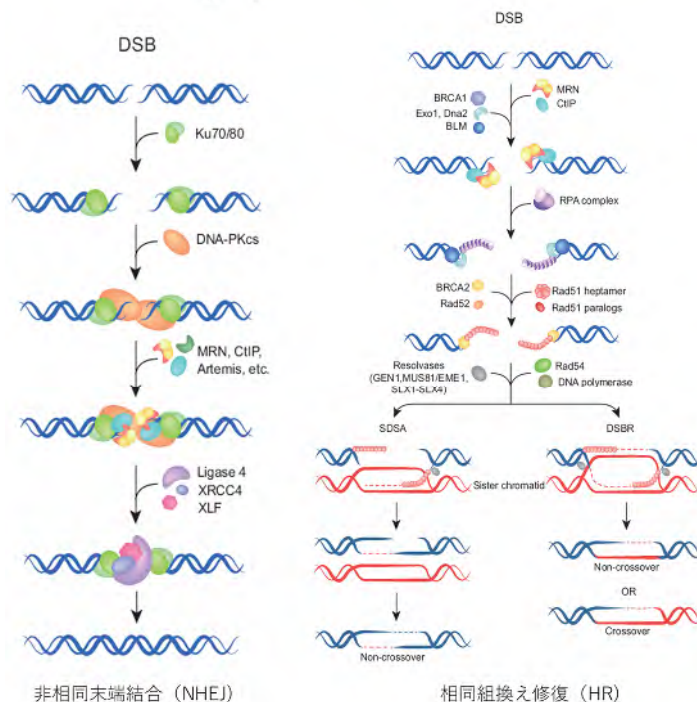
(Jones *et al*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2**, 249-260 (1993), Park *et al*, *Radiat. Res.* **141**, 11-18 (1995))

*HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl transferase

(関連する論文から)

TK6 細胞を改変して TK locus に I-SceI 認識配列を挿入した、TSCE5, TSCE2 細胞で検討 DNA2 本鎖切断後の修復は、大部分が非相同末端結合 (NHEJ, Non-homologous end joining) によるもので小さな欠失が起きる。一方で、修復ミスが起こりにくい相同組換え (HR, Homologous recombination) は NHEJ の 1/270 の確率でしか起きない。

Honma *et al*, *Environ. Mol. Mut.*, **42**, 288-298 (2003)



Translational Cancer Res., 2, 163-177 (2013)より

2. 突然変異誘導（放射線、変異原物質）

2-1 放射線による突然変異誘導による変化

生物種：イネ (*Oryza sativa* L.)

引用論文：Genes Genet Syst, **84**, 361-370 (2009)

実験条件

種子、花粉、植物体 100~300 Gy(10~50Gy/h)で γ -rays を照射、解析は TAIL-PCR で行った。
24 の変異のうち、15 変異は小さな欠失 (1~16 bp)、4 変異は大きな欠失 (9.4~130 kb)、3 変異は 1 塩基置換であり、中間の大きさの欠失 (100 bp~8 kb) はなかった。

また、2つの逆位が認められ、その範囲は 1,285 kb, 3208 kb であったことから、ガンマ線照射では小さな変異とともに変色体レベルの大きな変異も観察された。

具体的には、200 Gy (10 Gy/h)で照射した系統 YM15 と 02g200Gy は japonica rice 由来である。

文献中には、放射線照射後に、目的形質で選抜した後の変異体を解析しているが、何世代継代したものを解析しているのかの記載がない。解析している配列は、目的形質に関わる遺伝子のみであり、NGS が普及する前であるため全ゲノム解析は行っていない。

(解析結果は、次ページに表を示す)

ゲノム編集技術と関連する情報の収集と解析、ケーススタディー

No.	Allele	Mutation	Size	Sequence (5' - 3')	Position of mutation
1	<i>cao-g1</i>	deletion	1 bp	TATGCAA <u>AA</u> GAACA TATGCAA- <u>GA</u> ACA	AC087599: 42208/42209/42210
2	<i>cao-g2</i>	deletion	3 bp	TTTGCCAAGGGTT TTTGC---GGGTT	AC087599: 43797-43799
3	<i>cps-g1</i>	deletion	1 bp	GGCCAC <u>CT</u> GCAC GGCCAC- <u>TG</u> CAC	AP004872: 48297/48298
4	<i>ga3ox-g1</i>	deletion	1 bp	AGGAAGGGGAGAAG AGGAAGGG-AGAAG	AP002523: 125385/125386/125387/125388
5	<i>ga3ox-g2</i>	deletion	3 bp	GGTCGCC <u>CG</u> ACGTT GGTCG---ACGTT	AP002523: 124879-124881
6	<i>gid1-g1</i>	deletion	1 bp	GAGGAGGGGGCGGCG GAGGAGGGG- <u>CG</u> GCG	AC137928: 53651/53652/53653/53654/53655
7	<i>gid2-g1</i>	deletion	42.2 kbp	TGAGATG•••TTACATG TGAGA-•••••-ACATG	AP006161: 95795-137978
8	<i>glb1</i>	deletion	62.8 kbp	ATAATATA•••TGAAAA ATAATA-•••••-AAAA	AC113332: 15191-77983
9	<i>glu1</i>	deletion	129.7 kbp	TACCTCG•••AATTTA TACCT-•••••- ^G TTTA	AP005428: 44130- AP005875: 18726
10	<i>gluA1-g1</i>	deletion	1 bp	TGACCGAAAGT TGACC-AAAGT	AP003274: 112346
11	<i>gluA2-g1</i>	deletion	1 bp	GAATTGGCTCAA GAATTG-CTCAA	AC021891: 82815/82816
12	<i>gluA2-g2</i>	base substitution	1 bp	GCGTTCAACGC GCGTT _A AACGC	AC021891: 82000 (C/G → A/T)
13	<i>kao-g1</i>	deletion	4 bp	CCTCCCTCCGCCGC CCTCC----GCCGC	AP002805: 59563-59566/59567-59570
14	<i>kao-g2</i>	deletion	16 bp	CGCCGGC•••CGGCCACA CGCCG-•••••-CCACA	AP002805: 59964-59979
15	<i>pla1-g1</i>	deletion	5 bp	GAAGGCGTGGACGAG GAAGG-----ACGAG	AE017091: 254226-254230
16	<i>pla1-g2</i>	base substitution	1 bp	GCGTCTCCTTC GCGTC _A CCTTC	AE017091: 254549 (T/A → A/T)
17	<i>pla2-g1</i>	deletion	5 bp	GGTGCCGCCCGCC GGTGCC-----CGCC	AP006531: 92089-92093
18	<i>wx-g1</i>	deletion	2 bp	TCCGCCACGGGT TCCGCC--GGGT	AP002542: 91149-91150/91150-91151
19	<i>wx-g2</i>	deletion	5 bp	GGTGCTCACCGTGAG GGTGCT-----GTGAG	AP002542: 92735-92739
20	<i>wx-g3</i>	deletion	6 bp	CAGCCTTCTTTGCCAG CAGCC-----GCCAG	AP002542: 91976-91981
21	<i>wx-g4</i>	deletion	9.4 kbp	AGTCAA•••ATATCGA AGTCA-•••••-TCGA	AP002542: 88234-97663
22	<i>wx-g5</i>	base substitution	1 bp	TCTGGTATAAT TCTGG _A ATAAT	AP002542: 93203 (T/A → A/T)

Allele name, mutation type and size were shown.
 Sequence: Upper line shows the wild type, lower line shows the mutant. Hyphens in the lower sequence line represent deleted bases. Subscript and superscript letters show substituted and inserted bases, respectively. Underlining indicates microhomology.
 Position of mutation: The location where the mutation occurred is shown as the position in the genomic clone.

ゲノム編集技術と関連する情報の収集と解析、ケーススタディー

生物種：イネ (*Oryza sativa* L.)

引用論文：G3 Genes Genomes Genetics, **9**, 3743-3751 (2019)

実験条件

- (1) γ -rays from 150 to 450 Gy with a dose rate of 10 Gy/h (250 Gy がイネで一般的で LD30 相当)
- (2) 220 MeV C ions from 10 to 60 Gy の条件で照射した。

M6 progeny までを得る。

解析は、M6 mutant line それぞれ 7 株を NGS 解析。uSeq DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc.), and paired-end (2X150 bp) sequencing was performed on Illumina HiSeq X Ten to determine genomic sequences with about 30-fold depth for each line.

変異誘導結果 (頻度とパターン)

M5 における変異結果として

γ -rays の結果では、1 塩基変異、欠失、挿入が平均 57.0, 17.7, 5.9 個
変異頻度は、 $(23.1 \pm 1.5) \times 10^{-8}$ per bp であった。

C ions の結果では、1 塩基変異、欠失、挿入が平均 43.7, 13.6, 5.3 個
変異頻度は、 $(18.3 \pm 3.4) \times 10^{-8}$ per bp であった。

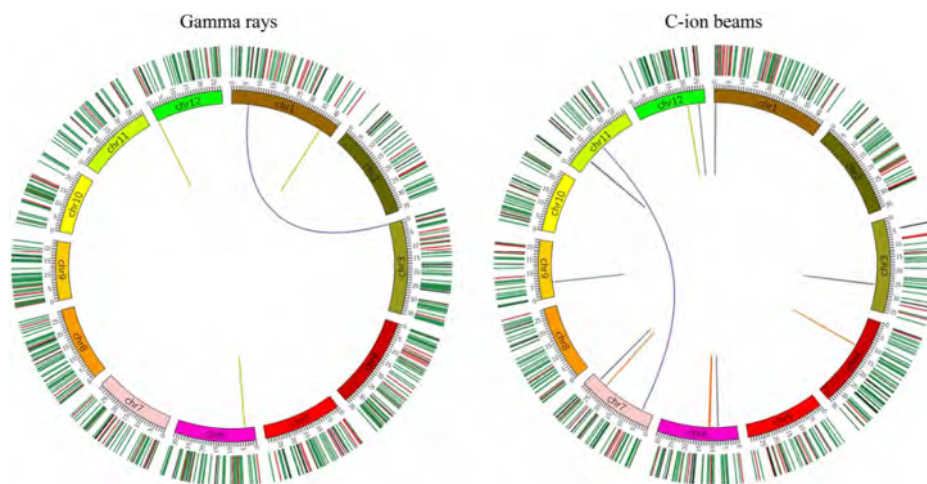
この結果から、直接比較することは難しいが、自然変異より 10 倍程度大きいと考えられる。

また、変異パターンは、G/C から A/T 変移が最も多かった

(43.0 \pm 3.4% in γ -rays and 46.7 \pm 6.6% in C ions)。

InDel では、+1 bp ~ -4 bp が最も多く 72.8 \pm 7.4% in γ -rays and 60.4 \pm 12.2% in C ions だった。

100 bp 以上の欠失や重複、転移などの構造的変異 (SV) は C ions の方が多かった。



2 CRISPR/Cas システム (種類、構造、作用機構、起こる変化)

2-1 分類

最も利用されているものは、class 2 に属する Cas9, Cas12, Cas13 などである。

Table 1. Cas class and type

	type	subtype #	endonuclease	target
Class 1	I	7	Cas3	DNA
	III	4	Cas10	DNA/RNA
	IV	1	--	--
Class 2	II	3	Cas9	DNA
	V	3	Cas12	DNA
	VI	3	Cas13	RNA

Type II の Cas の代表的なものを下に記した。

Casの種類 (DNA切断型)

代表的なtype II型 Cas9

Cas ortholog	PAM	size (a.a)
<i>Francisella novicida</i>	NGG	1,628
<i>Streptococcus pyogenes</i>	NGG	1,368
<i>Staphylococcus aureus</i>	NNGRRT	1,053
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	NNNLCNDD	1,092
<i>Neisseria meningitidis</i>	NNNNGATT	1,081
<i>Campylobacter jejuni</i>	NNNRYAC	984

最も研究されている *spCas9*

最も小さい *cjCas9*

*spCas9*の改良型 : e-*spCas9*, *spCas9*-HF, HiFi-Cas9, sniper-Cas9, etc

Cas9以外のCas

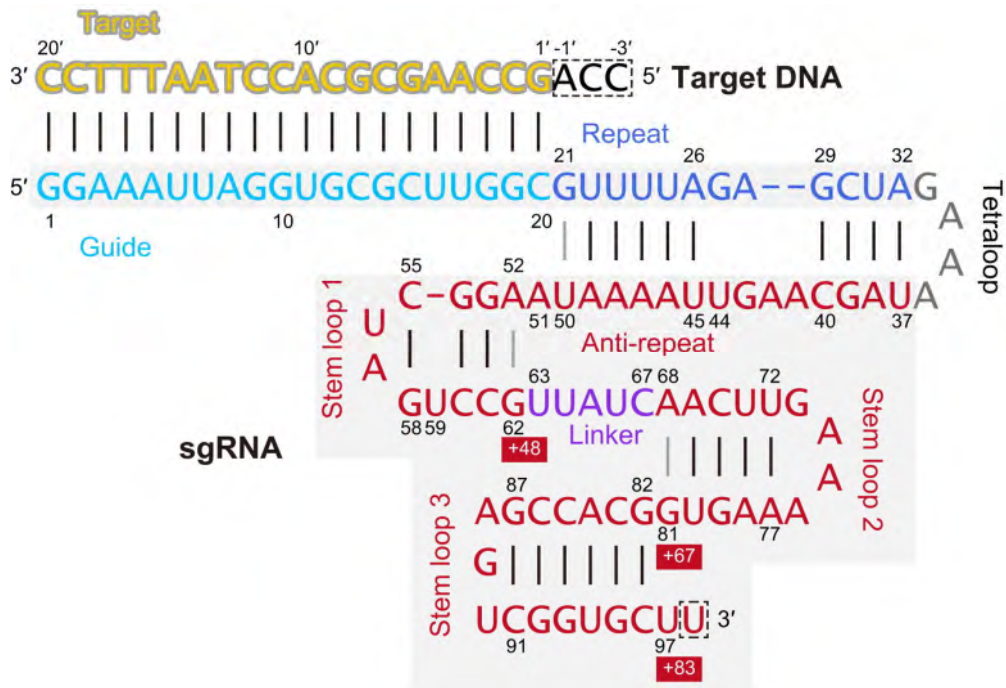
Cas 12a(cpfl), 12b, 12c, 12g, 12h, 12i, ... Yan et al, Science (2019)

Cas 13a(C2C2), 13b, 13c, 13d, ... Abandayyeh et al, Science (2016)

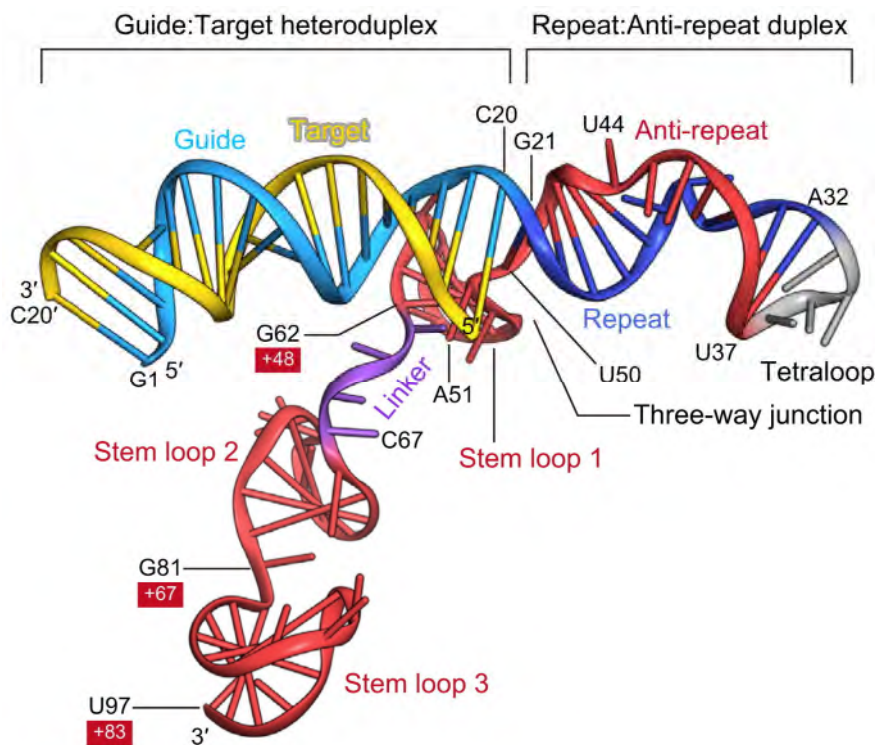
Cas 14, ... Horigton et al, Science (2018)

2-2 構造

1) 標的 DNA と gRNA との相補結合 (平面図)

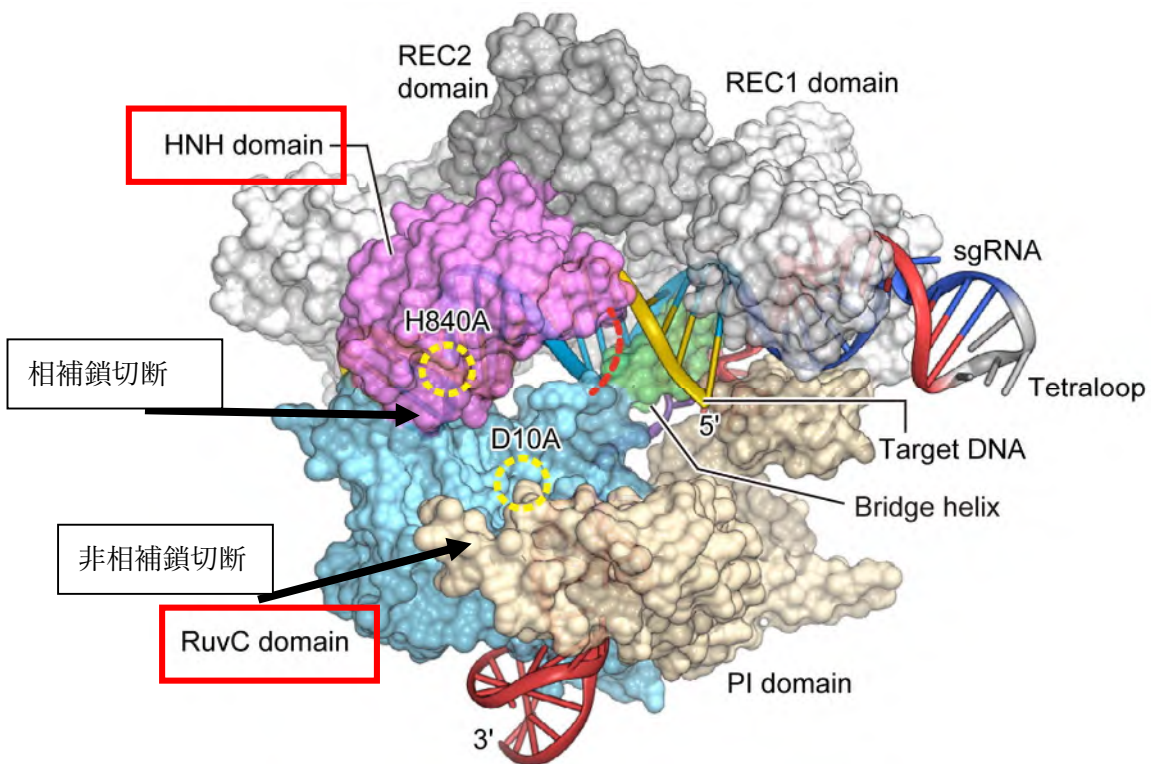
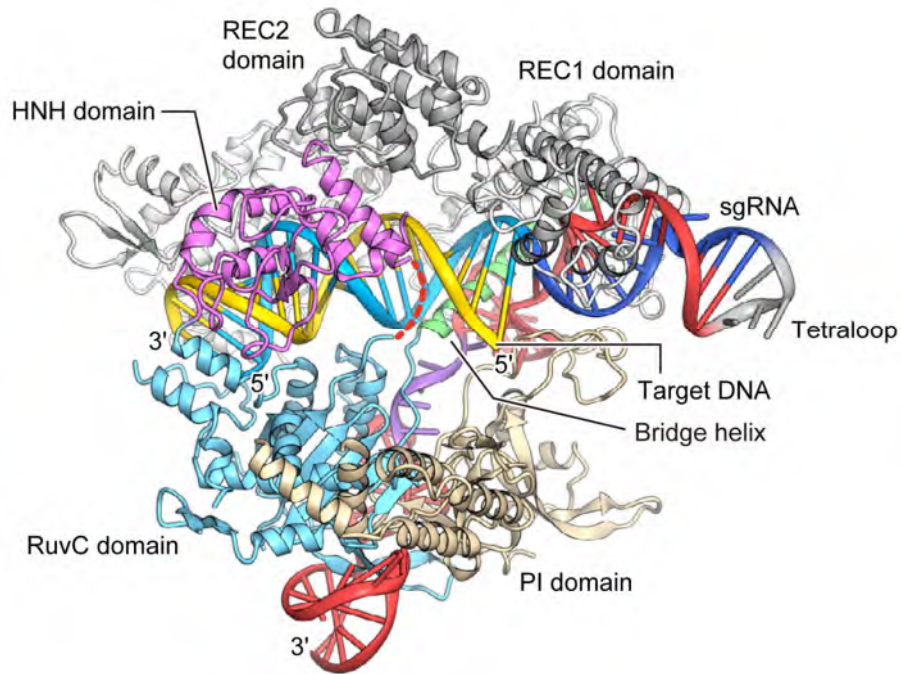
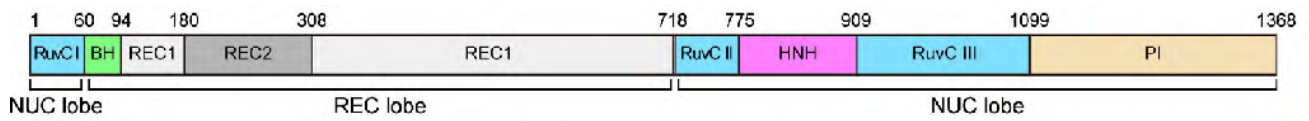


2) 標的 DNA と gRNA との相補結合 (立体図)



図は *Cell*, 156 935-949 (2014) より

ゲノム編集技術と関連する情報の収集と解析、ケーススタディー



図は *Cell*, 156 935-949 (2014) より一部改変

2-3 作用機構

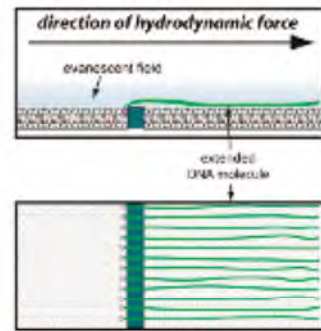
1) 標的配列のスキャン (Cas9 がどのように標的配列を検索して結合するか?)

(DNA curtain) 脂質 2 重膜に直鎖上の DNA 2 本鎖 (図では 48 kb λ DNA) をカーテンのように固定して並べる (図 1)。

ここに、ピンクに標識した (YOYO) Cas9 を
 緑で標識した DNA 上をスキャンする様子
 gRNA が存在しないと、PAM をごく短時間スキャン
 しながら動くが、gRNA ($\lambda 2$ 標的) が存在するとより
 長い時間、強く結合する (図 2A, B)。

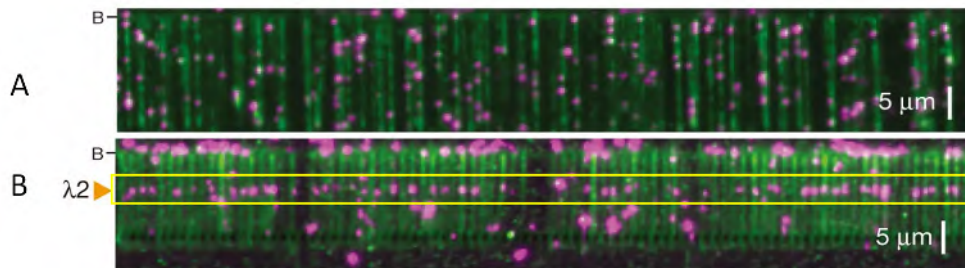
(*Nature*, 507, 62-67 (2014) より)

図 1



DNA curtain

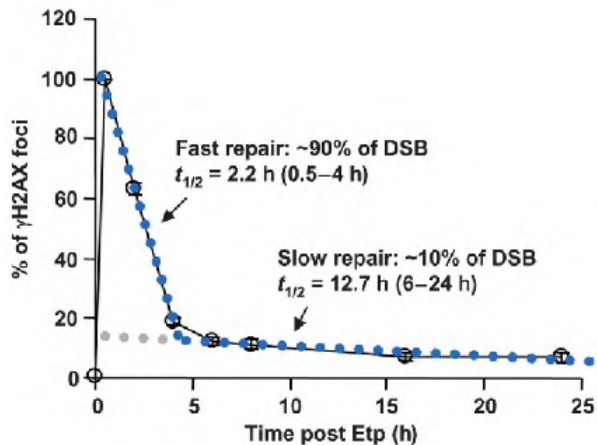
図 2



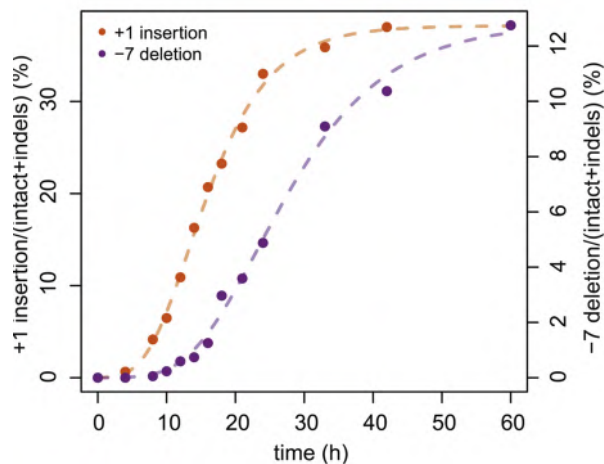
2) 速度論的解析 (どれくらいの時間、結合修復に要するか)

放射線 (5 Gy) による DNA 切断後の再結合実験では、再結合は 2 相性で早い再結合では 18.0~36.4 min、遅い再結合では 1.5~5.1 h である (*Br J Cancer*, **71**, 311-316 (1995))。その他の報告でも同様である (10~60 min)。

DNA2 本鎖マーカー γ -H2AX を指標にした実験では、照射によって生じた γ -H2AX は 1~3 h で消失した。また、50 μ M Etp(エトポシド)処理した細胞では、90%が 0.5~4 h で、残り 10% は 6~24 h で生じた γ -H2AX は消失した (下図)。 (*EMBO J*, **30**, 1079-1092 (2011)より)



DNA2 本鎖切断の修復は、細胞周期にも依存するが大部分は非相同末端結合 (NHEJ, MMEJ) により、残りは相同組換え(HR)の機構により起こる。NHEJ では小さな indel が起き、MMEJ ではそれよりは大きい deletion が起きる。。ここで、非相同末端結合による修復を詳しく見ると MMEJ (micro-homology mediated end-joining)による deletion (-7 bp)は c-NHEJ (canonical non-homologous end-joining) による indel (+1 bp)よりも時間を要する。NHEJ 軽油を阻害すると MMEJ 経路が増加する



(Cas9 による切断修復、*Mol Cell* **70**, 801-813 (2018)より)

ゲノム編集技術と関連する情報の収集と解析、ケーススタディー

50%修復時間は、サイトにより異なり 1.4~10.7 h であり、放射線による DNA 切断修復の 1 h 以内に比べて長い (Cas9-RNP で誘導した場合)。

Cas9 が DNA から遊離する速度は、PAM-distal 部位で $1.0 \pm 0.2 \times 10^{-5}/s$ 、PAM-proximal 部位で $6.0 \pm 0.8 \times 10^{-6}/s$ であった (*Nat Biotech*, **34**, 340-345 (2016))。

Cas9 と gRNA の複合体の結合力は、抗体 (mAb) の解離定数 nM レベルよりもかなり強く 10 pM である (*PNAS* **112**,2984-2989 (2015))。

Table 1.

Equilibrium dissociation constants for protein–sgRNA interactions

^a Three independent experiments were performed for each condition, and the values represent the mean \pm SEM.

Protein	Equilibrium dissociation constant (K_d) for indicated sgRNA ^a		
	Full-length	Δ Hairpins1-2	Δ Spacer–nexus
WT Cas9	10 ± 2 pM	0.86 ± 0.12 nM	16 ± 2 pM
α -Helical lobe	0.75 ± 0.12 nM	0.70 ± 0.13 nM	>100 nM
Nuclease lobe	0.30 ± 0.07 nM	>100 nM	0.17 ± 0.06 nM
Split-Cas9	0.23 ± 0.04 nM	1.05 ± 0.05 nM	0.17 ± 0.07 nM

最後に、変異導入効率は、手法、標的配列によりさまざまであり、0.1%以下から数十%までである。これは、自然変異や放射線などの突然変異育種よりもかなり高いが、標的部位のみに変異が導入されるのであれば、特に懸念することはないものと考えられる。

2. 開発動向・ケーススタディー

現在、ゲノム編集分野におけるもっとも重要な課題は、いかにオフターゲット変異を抑制するか、および、設計する上での配列上の制約を可能な限りなくす、の2点に集約される。

前者については、当初の DNA2 本鎖切断を誘導しない塩基置換 (base editing) が活発に研究されているが、C->T 変異を誘導する CBE、A->G 変異を誘導する ABE いずれにおいても、当初想定外であったオフターゲット変異が多いことが判明して、それらの改良法が報告されている。また、CBE と ABE による塩基置換は、SpCas9 が認識する PAM から $\sim 15 \pm 2$ nt に位置し、かつプロトスペーサー上の狭いウィンドウ内に位置する塩基に限定されてしまう制約も存在する。現状では、DNA2 本鎖を切断しないことからオフターゲット切断を回避できる期待されたが、意図しない変異の問題は解決されていない。

後者について、ゲノム編集の主流である CRISPR/Cas9 では 20 塩基 (nt) の標的配列の他に、その 3' 側に PAM と呼ばれる 3 nt の NGG 配列が必要である。この制約を緩めるために、NGG の制約を、オフターゲットを最大限抑制しながら NG にした変異体 (spCas9-NG) 開発されている。さらに、この spCas9-NG に塩基編集を適用した spCas9-NG-AID が解析されているが、これらの意図しない変異については十分に検討されているとは言えない。spCas9-NG は、すでにイネとシロイヌナズナに応用されている。

その他に、Cas12a や Cas13a は、標的 DNA または標的 RNA の切断時に一本鎖 DNA または一本鎖 RNA を非特異的に切断する性質を有する。